Archive of SID

پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۰ (۱): ۹۶-۸۳ (۱۴۰۰)

DOI: 10.22034/ARPP.2021.12442

مهار بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی با کاربرد سیلیکون، نانو ذرات سیلیکون و باکتری آنتاگونیست *Bacillus methylotrophicus* در شرایط گلخانه‌ای

دریافت: ۹۸/۱۲/۲۲ بازنگری: ۹۹/۶/۲۹ پذیرش: ۹۹/۹/۲۸

علی ویانی[۱]✉، پروانه سادات جوراب باف[۱]، ناصر علی اصغرزاد[۲]

[۱] گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، [۲] گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز. ✉viani@tabrizu.ac.ir

چکیده

در این پژوهش تاثیر باکتری آنتاگونیست *Bacillus methylotrophicus* در مهار زیستی باکتری *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* عامل بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی و همچنین تاثیر مواد القا کننده مقاومت سیستمیک اکتسابی شامل سیلیکون و نانوذرات سیلیکون بر هر دو باکتری در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. در آزمون‌های حلقه‌های کاغذی و نشت در چاهک، سیلیکون و نانوذرات سیلیکون هیچ نوع هاله بازداری علیه این دو باکتری ایجاد نکردند اما باکتری آنتاگونیست *B. methylotrophicus* در هر دو آزمون و همچنین آزمون کلروفرم توانست هاله بازداری از رشد باکتری بیمارگر به‌ترتیب به شعاع ۹، ۸/۵ و ۱۵میلی‌متر را ایجاد کند. پس از گذشت ۶ و ۱۰ ساعت از کشت در محیط مایع، نانوذرات سیلیکون، جمعیت هر دو باکتری بیمارگر و آنتاگونیست را اندکی کاهش داد اما پس از گذشت ۲۴ ساعت، تفاوت آنها با شاهد معنی‌دار نبود. سیلیکون در محیط کشت مایع نتوانست از رشد هیچ‌کدام از باکتری‌ها ممانعت کند. در شرایط گلخانه‌ای، تیمارهای سیلیکون و نانو ذرات سیلیکون و نیز باکتری آنتاگونیست، وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی را در مقایسه با تیمار شاهد مثبت به‌طور معنی‌داری افزایش دادند و بیشترین تاثیر، درتیمارهای ترکیبی سیلیکون یا نانوذرات سیلیکون با باکتری آنتاگونیست مشاهده شد. تمامی تیمارها در مقایسه با شاهد آلوده توانستند پوسیدگی نرم را در گیاهان سیب‌زمینی به‌طور کامل مهار کنند و هیچ علائمی از بیماری در آنها مشاهده نگردید، در حالیکه در تیمارهای شاهد، تمامی غده‌های کشت شده، نشانه‌های لهیدگی و پوسیدگی را بروز داده و از بین رفتند.

کلمات کلیدی: پوسیدگی نرم، مقاومت القایی، مقاومت سیستمیک اکتسابی، مهار زیستی

Control of potato soft rot disease using silicon, silicon nanoparticles and antagonistic bacterium *Bacillus methylotrophicus* at glasshouse conditions

Received: 12 Mar 2020 Revised: 19 Sep 2020 Accepted: 18 Dec 2020

Ali Viani[1]✉, Parvaneh Joorabbaf [1], Naser Aliasgharzad[2]

[1]*Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.* [2]*Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.* ✉viani@tabrizu.ac.ir

Abstract

In this research, the effect of *Bacillus methylotrophicus* in biological control of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, the causal agent of potato soft rot disease, as well as the effects of silicon and silicon nanoparticles, the two systemic acquired resistance inducer compounds, against both pathogenic and antagonistic bacteria was evaluated in laboratory and glasshouse conditions. In the disc diffusion and well diffusion assays, silicon and silicon nanoparticles did not produce any inhibitory zone around the tested bacteria, but the antagonistic bacterium, *B. methylotrophicus*, produced an inhibitory zone of growth in the same and chloroform assays with a radius of 9, 8.5 and 15 millimeters, respectively. Although, silicon nanoparticles slightly reduced populations of both pathogenic and antagonistic bacteria after 6 and 10 hours post culturing in liquid medium, but after 24 hours, the differences between them and control treatment were not significant. Silicon did not inhibit the growth of the tested bacteria in liquid medium. At glasshouse conditions, all treatments of silicon and silicon nanoparticles as well as antagonistic bacterium were significantly increased the fresh and dry root and shoot weight in compare to positive control, but the best result was achieved by combined treatments of silicon or silicon nanoparticles with antagonistic bacterium. All the treatments completely inhibited disease development on potato plants in compare to positive control and no disease symptoms were observed whereas in control treatments all the tubers showed maceration and rotting symptoms and were destroyed.

Keywords: Biological control, Induced resistance, Soft rot, Systemic acquired resistance

How to cite:

Viani A, Joorabbaf P, Aliasgharzad N, 2021. Control of potato soft rot disease using silicon, silicon nanoparticles and antagonistic bacterium *Bacillus methylotrophicus* at glasshouse conditions. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 10 (1): 83-96.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سیب‌زمینی با نام علمی *Solanum tuberosum* L. گیاهی یکساله از تیره Solanaceae است که نقش مهمی در تامین مواد غذایی مردم داشته و با داشتن میزان تولید ۳۶۸ میلیون تن محصول در سطح جهان، بعد از ذرت، برنج و گندم در رده چهارم تولید قرار دارد (FAO 2018). ایران با داشتن ۱۴۸ هزار هکتار سطح زیر کشت سیب‌زمینی و تولید سالانه ۵ میلیون تن محصول، در بین کشورهای تولیدکننده سیب‌زمینی دارای رتبه چهاردهم می‌باشد (Ahmadi *et al.* 2019). باکتری *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben *et al.* یکی از عوامل مهم بیماریزا است که در چندین گیاه زراعی مهم از جمله سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و هویج پوسیدگی نرم ایجاد می‌کند (Saha *et al.* 2015). مهار زیستی با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست از جمله گونه‌های *Bacillus* از راهکارهای مهم در مدیریت این بیماری می‌باشد (Gerayeli *et al.* 2017). باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) علاوه بر کاهش بیماری موجب افزایش شاخص‌های رشدی و تحریک مقاومت سیستمیک در آنها می‌شوند (Yousefi *et al.* 2011). بسیاری از استرین‌های باسیلوس، تعداد زیادی مواد با خاصیت ضد میکروبی از جمله آنتی بیوتیک‌ها را برای حفاظت از گیاهان تولید می‌کنند (Onjena & Jacques 2007). لیپوپپتیدها (Lipopeptides) عمده‌ترین ترکیبات ضدمیکروبی ترشح شده به‌وسیله گونه‌های باسیلوس هستند و نقش مهمی در مهار بیمارگرهای گیاهی دارند (Omaridient *et al.* 2016). از بین باکتری‌های گرم مثبت، کاربرد دو گونه *Bacillus pumilus* Meyer and Gottheil و *B. amyloliquefaciens* (ex Fukumoto) Wang *et al.* باعث کاهش پوسیدگی نرم غده‌های سیب‌زمینی به‌ترتیب به‌میزان ۶۳/۷ و ۴۷/۸ درصد شده است (Gerayeli *et al.* 2017). یکی از گونه‌های این جنس، *B. methylotrophicus* Madhaiyan *et al.* است و تحقیقات صورت گرفته طی دهه گذشته نشان داده‌اند که این گونه به همراه *B. amyloliquefaciens* از عوامل مهار زیستی و تحریک کننده رشد گیاهی هستند (Shan *et al.* 2013; Shi *et al.* 2014). باکتری *B. methylotrophicus* در آزمایش‌های گلخانه‌ای، بیماری کپک خاکستری گوجه‌فرنگی ناشی از قارچ *Botrytis cinerea* Pers. را ۶۰ درصد (Ge *et al.* 2016) و در شرایط مزرعه‌ای، پوسیدگی پایه ذرت ناشی از قارچ *Fusarium graminearum* Schwabe را ۷۹ درصد (Li *et al.* 2016b) کاهش داده است همچنین این گونه، به‌عنوان عامل مهار زیستی بیماری بلاست برنج نیز شناخته می‌شود (Shan *et al.* 2013). با کاربرد سوسپانسیون این باکتری با غلظت 10^9 سلول در میلی‌لیتر روی میوه‌ها، برگ‌ها و ساقه‌های درختان هلو آلوده به پوسیدگی قهوه‌ای درختان میوه، ممانعت از بیماری در این اندام‌ها به‌ترتیب ۶۴/۳، ۹۷/۳ و ۶۴ درصد بوده است (Yuan *et al.* 2019).

سیلیکون یکی از عناصری است که وجود آن برای اغلب گیاهان ضروری نیست اما گیاهان با استفاده از آن، بهتر می‌توانند خود را با تنش‌های محیطی وفق دهند (Luyckx *et al.* 2017). با کاربرد سیلیکون در گیاه برنج، این ماده در دیواره سلول‌های اپیدرمی رسوب کرده و باعث استحکام برگ‌های برنج و کاهش آلودگی به‌وسیله قارچ‌های *Rhizoctonia solani* Kuhn و *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker می‌شود (Zhang *et al.* 2013; Ning *et al.* 2014). در تحقیقی، مدیریت پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی با تلفیق سیلیکون و *Pseudomonas fluorescens* Migula مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که تیمار خاک با این باکتری آنتاگونیست و پاشش سیلیکون با غلظت سه میلی مولار روی اندام‌های هوایی، بیشترین تاثیر را در کاهش شاخص‌های بیماری و افزایش رشد گیاه دارد (Tavakkol *et al.* 2014). طی تحقیقی در کشور چین، سیلیکون و BTH (Benzothiadiazole) به‌صورت پاشش برگی برای کنترل پژمردگی باکتریایی توتون مورد استفاده قرار گرفته است (Li *et al.* 2016a).

امروزه توسعه فن‌آوری موجب افزایش کاربرد مواد نانو در رشته‌های مختلف علمی و صنعتی شده است اما در بخش کشاورزی پیشرفت با کندی همراه بوده و دستاوردهای کمتری حاصل شده است (Haghighi & Pessarakli 2013). یکی از موادی که در سال‌های اخیر در بخش‌های مختلف کشاورزی مورد استفاده قرار گرفته است، نانوذرات می‌باشد ولی کاربرد آنها، هنوز در مراحل ابتدایی قرار دارد. نانوذرات سیلیکون ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی متفاوتی از ذرات معمولی آن دارند که به‌دلیل اندازه کوچک، بیشتر بودن نسبت سطح به وزن و شکل‌های مختلف آنها است (O' Farrell *et al.* 2006). نانوذرات سیلیکون به‌خاطر دارا بودن ویژگی‌های منحصربه‌فرد، می‌توانند تنش‌های غیر زیستی را در گیاهان کاهش دهند (Cui *et al.* 2017). به‌عنوان نمونه، تیمار بذور گوجه‌فرنگی با نانوذرات سیلیکون در غلظت یک میلی‌مولار باعث سازگاری گیاهان به تنش شوری شده و رشد ریشه‌ها و ساقه‌ها را زیاد کرده است (Haghighi *et al.* 2012) همچنین سیلیکون و نانوذرات سیلیکون در غلظت یک و دو میلی‌مولار در گیاه سیب‌زمینی، اثر تنش شوری را

www.SID.ir

Archive of SID

تخفیف داده‌اند (Haghighi & Pessarakli 2013). نانوذرات سیلیکون در گندم در غلظت‌های ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، فعالیت‌های فتوسنتزی و رشد گیاه را تسهیل کرده‌اند (Sun *et al.* 2016). استفاده از این ماده سبب تحمل به شوری (Haghighi & Pessarakli 2013)، افزایش وزن تر و خشک ریشه و ساقه گندم در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر شده است (Karimi & Mohsenzadeh 2016). در مطالعه‌ای، نشان داده شد که نانو ذرات سیلیکون اثر مثبتی روی باکتری‌های مفید خاک دارد (Karunakaran *et al.* 2013). نتایج برخی تحقیقات نشان داده است که نانو ذرات سیلیکون در گیاهان ذرت، نقش مهمی در افزایش جمعیت میکروبی مفید خاک مانند باکتری‌های حل‌کننده فسفات و سیلیکات و تثبیت کننده‌های نیتروژن داشته است و به‌این‌ترتیب، محتوای کربن، نیتروژن، فسفر و سیلیکون محلول افزایش یافته است و با تامین مواد معدنی مورد نیاز گیاه رشد آن را تقویت کرده‌اند (Rangaraj *et al.* 2014).

با توجه به اینکه تاکنون هیچ گزارشی در مورد کاربرد سیلیکون و به ویژه نانوذرات سیلیکون در گیاهان سیب‌زمینی و تاثیر آنها بر پوسیدگی نرم و نیز مهار زیستی بیماری به وسیله باکتری *B. methylotrophicus* وجود ندارد لذا هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر این مواد و باکتری آنتاگونیست مذکور، در مهار بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی و بررسی اثر آنها بر برخی از ویژگی‌های رشدی گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

باکتری آنتاگونیست *B. methylotrophicus* از شرکت رویان تیسان سبز و باکتری بیمارگر *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* از آزمایشگاه باکتری شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان (که قبلا با استفاده از نشانگرهای مولکولی شناسایی شده و بیماریزایی آن به اثبات رسیده بود) تهیه شد. نانوذرات سیلیکون نیز به فرم خالص از شرکت بایوکم تهیه شد. به‌دلیل عدم حلالیت سیلیکون خالص در آب و عدم امکان جذب آن برای گیاه، از سیلیکات پتاسیم (حاوی ۱۵درصد سیلیکون و شش درصد اکسید پتاسیم) استفاده شد. با توجه به وجود پتاس در این ترکیب، برای داشتن یکنواختی در تمام تیمارهای گلخانه‌ای، به همه تیمارهای دیگر، محلول شش درصد اکسید پتاسیم در نسبت مربوط به خود اضافه گردید تا تیمارها اختلافی از نظر وجود پتاس نداشته و تنها از نظر نوع مواد القاکننده و غلظت مورد استفاده از آنها، مورد بررسی قرار گیرند.

بررسی آزمایشگاهی تاثیر سیلیکون، نانوذرات سیلیکون و باکتری B. methylotrophicus بر علیه باکتری P. carotovorum subsp. carotovorum

الف- روش حلقه‌های کاغذی: برای بررسی تاثیر سیلیکون و نانوذرات سیلیکون و خاصیت آنتاگونیستی باکتری باسیلوس، از روش Bhat *et al.* (2017) استفاده شد. حلقه‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از کاغذ صافی سترون تهیه شده و به‌طور جداگانه با غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار سیلیکون و نانوذرات سیلیکون و با غلظت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری آنتاگونیست آغشته شدند. در این غلظت از باکتری، میزان جذب نوری در طول موج ۶۵۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer). برابر با عدد یک بود. در تیمار شاهد، آب مقطر سترون به حلقه‌های کاغذی اضافه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتری بیمارگر با غلظت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر روی محیط کشت جامد آگار مغذی (Nutrient Agar) پخش و به روش چمنی کشت شد. پس از خشک شدن سطح محیط کشت، در هر تشتک پتری چهار عدد حلقه کاغذ صافی مربوط به تیمارهای مختلف قرار داده شد. تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند سپس شعاع هاله بازداری در اطراف حلقه‌های کاغذی اندازه‌گیری شد.

ب- روش نشت در چاهک: در بررسی اثر آنتاگونیستی *B. methylotrophicus* به روش نشت در چاهک، از روش Balouiri *et al.* (2016) استفاده گردید. از کشت‌های ۲۴ ساعته باکتری بیمارگر، سوسپانسیونی با غلظت 10^8 سلول باکتری در میلی‌لیتر تهیه شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت آگار مغذی به روش چمنی کشت شد. چاهک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر به تعداد چهار عدد در هر تشتک پتری ایجاد و در داخل هر کدام به‌طور جداگانه ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری آنتاگونیست با غلظت 10^8 و یا ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نانوسیلیکون و سیلیکون با غلظت-های یک، دو و چهار میلی مولار ریخته شد. در تیمار شاهد از آب مقطر سترون استفاده گردید. تشتک‌های پتری به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله بازداری در اطراف چاهک‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

ج- آزمون کلروفرم: جهت تعیین میزان بازداری باکتری آنتاگونیست از رشد باکتری بیمارگر از آزمون کلروفرم با روش Khodakaramian & Zafari (2009) استفاده شد. ابتدا باکتری

www.SID.ir

Archive of SID

آنتاگونیست به‌صورت لکه‌ای در چهار گوشه از محیط کشت NA کشت شد و پس از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، کلونی‌های رشد کرده باکتری توسط پنبه آغشته به الکل ۹۶ درصد از سطح محیط کشت پاک شدند. سه قطره کلروفرم در قسمت داخلی درب هر تشتک پتری ریخته شد و پتری‌های دربسته به مدت ۲۰ دقیقه به‌صورت وارونه نگهداری شدند. سپس درب تشتک‌های پتری در شرایط سترون باز شد و مدت ۳۰ دقیقه هوادهی انجام گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بیمارگر توسط میله شیشه‌ای به‌صورت چمنی در هر تشتک پتری پخش شد و تشتک‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. میانگین شعاع هاله بازداری از رشد بیمارگر یادداشت گردید. در تیمار شاهد (بدون کشت باکتری آنتاگونیست) فقط سه قطره کلروفرم در قسمت داخلی درب تشتک پتری ریخته شد و پس از هوادهی، باکتری بیمارگر به روش چمنی کشت گردید.

بررسی تاثیر سیلیکون و نانو ذرات سیلیکون بر باکتری‌های بیمارگر و آنتاگونیست در محیط کشت مایع

صد میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بیمارگر (*P.c*) با غلظت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر به داخل ظروف ارلن مایر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مغذی مایع (Nutrient Broth) افزوده شد. نانوذرات سیلیکون در غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار (تیمارهای NS1 + *P.c*، NS2 + *P.c*، NS4 + *P.c*) به این محیط اضافه گردید. محیط کشت دارای باکتری بیمارگر و فاقد ترکیبات مذکور، به‌عنوان تیمار شاهد (*P.c*) در نظر گرفته شد. سیلیکون نیز با همان غلظت‌های مشابه با چهار تیمار شامل S1 + *P.c*، S2 + *P.c*، S4 + *P.c* و *P.c* بررسی شد. رشد باکتری بیمارگر با اندازه‌گیری میزان جذب نوری (Optical Density) محیط کشت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، در شش مرحله زمانی مختلف یعنی ۰، ۲، ۴، ۶، ۱۰ و ۲۴ ساعت پس از کشت، اندازه‌گیری شد. در مورد باکتری آنتاگونیست (*B.m*) نیز تاثیر نانوذرات سیلیکون (با تیمارهای NS1 + *B.m*، NS2 + *B.m*، NS4 + *B.m* و سیلیکون (با تیمارهای S1 + *B.m*، S2 + *B.m*، S4 + *B.m* و *B.m*) طی آزمایش‌های مشابهی مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی تاثیر مواد القا کننده مقاومت و باکتری آنتاگونیست بر بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در گلخانه

در آزمایش گلخانه‌ای، به‌ازای هر ۱۰۰ گرم از پرلیت سترون شده که به‌عنوان حامل میکروبی (Rasipour & Aliasghar-Zad 2017) مورد استفاده قرار گرفت، ۲۵-۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری بیمارگر با جمعیت 10^9 سلول در هر میلی‌لیتر به آن اضافه گردید تا باکتری‌ها جذب ذرات پرلیت شده و به‌آسانی در اثر آبیاری از خاک شسته نشوند. پرلیت آغشته به بیمارگر، به‌مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور نگه‌داری شد و سپس به نسبت ۴:۱ با خاک پاستوریزه مخلوط گردید. غده‌های سیب‌زمینی رقم اگریا به قطعاتی با اندازه مناسب تقسیم شده و بعد از ضدعفونی و شستشو با آب مقطر سترون، به‌مدت هشت ساعت در محلول یک، دو و چهار میلی‌مولار سیلیکون و نانوذرات سیلیکون و یا در سوسپانسیون سلول‌های باکتری آنتاگونیست قرار گرفتند و در خاک مایه‌زنی شده با بیمارگر، کشت گردیدند. در تیمارهای ترکیبی نیز، غده‌های سیب‌زمینی ابتدا در محلول سیلیکون و نانوذرات سیلیکون با همان غلظت‌های ذکر شده و سپس در سوسپانسیون باکتری آنتاگونیست قرار گرفتند. در تیمار شاهد منفی، غده‌های ضدعفونی شده، بدون آغشتگی به هیچ ماده‌ای، در خاک پاستوریزه بدون عامل بیماریزا کشت شدند ولی در تیمار شاهد مثبت، غده‌های ضدعفونی شده بدون تیمار با ترکیبات یا آنتاگونیست، در خاک آلوده به عامل بیماریزا کشت گردیدند. گلدان‌ها در شرایط گلخانه‌ای و در دمای ۲ ± ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار هفته نگه‌داری و هر هفته از نظر علائم بیماری مورد بررسی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری شدت بیماری و ویژگی‌های رشدی بوته‌ها

یک ماه پس از رشد گیاهان سیب‌زمینی، شدت بیماری طبق مقیاس Azadmanesh *et al*. (2017) در مقیاس صفر تا شش بر اساس درصد پژمردگی برگ‌ها اندازه‌گیری شد. در پایان آزمایش، بوته‌ها با دقت از خاک خارج شده و پس از شسته شدن با آب، وزن تر ریشه‌ها و اندام‌های هوایی به‌طور جداگانه اندازه‌گیری شد سپس با قرار دادن نمونه‌ها در داخل دستگاه آون با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز، وزن خشک آنها یادداشت گردید. آزمایش مربوط به اندازه‌گیری شدت بیماری در شرایط گلخانه‌ای سه بار تکرار شد تا از نتایج به‌دست آمده اطمینان حاصل شود.

طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تیمار شامل غلظت‌های مختلف سیلیکون و نانوذرات سیلیکون، باکتری

www.SID.ir

Archive of SID

آنتاگونیست و تیمارهای ترکیبی از آنها در سه تکرار درگلخانه انجام گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ver.22 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج

روش حلقه کاغذی

بر اساس نتایج حاصل شده، تیمارهای سیلیکون و نانوذرات سیلیکون در غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار نتوانستند از رشد باکتری‌های بیمارگر و آنتاگونیست ممانعت کنند و در محیط کشت، هیچ نوع هاله بازداری از رشد این دو باکتری مشاهده نگردید. پس از کشت چمنی باکتری بیماریزا در محیط کشت جامد آگار مغذی، حلقه‌های کاغذی آغشته به باکتری آنتاگونیست توانستند مانع رشد باکتری بیمارگر شده و هاله بازداری به شعاع ۹ میلی‌متر در اطراف حلقه‌های کاغذی ایجاد کنند.

روش نشت در چاهک

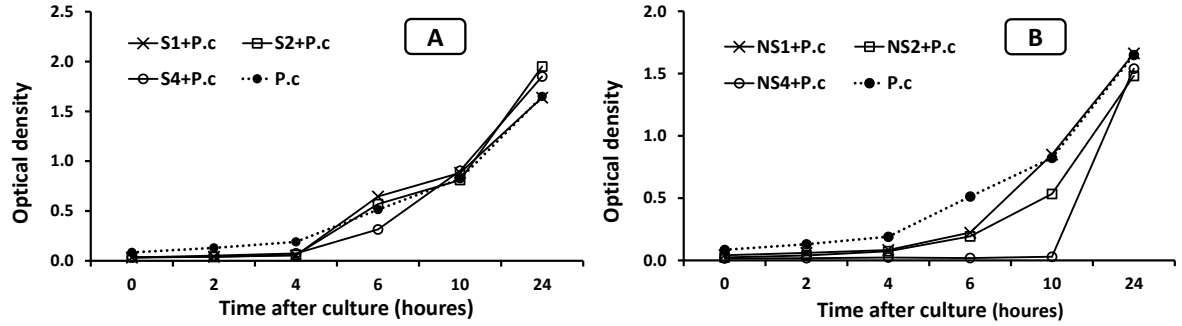
در روش چاهک، سیلیکون و نانوذرات سیلیکون در غلظت-های یک، دو و چهار میلی‌مولار نتوانستند هیچ نوع هاله بازدارندگی از رشد در باکتری‌های بیماری‌زا و آنتاگونیست ایجاد کنند اما باکتری آنتاگونیست، هاله‌ی بازدارندگی به شعاع ۸/۵ میلی‌متر در سطح محیط کشت حاوی باکتری بیماری‌زا ایجاد کرد.

آزمون کلروفرم

نتایج آزمون کلروفرم نشان داد که در بخش‌هایی از محیط‌کشت که قبلاً در آن نواحی باکتری آنتاگونیست کشت شده و سپس این باکتری از محیط حذف گردیده بود، باکتری بیماری‌زا قادر به رشد نبوده و هاله بازدارندگی به شعاع ۱۵میلی‌متر در این نواحی مشاهده شد.

تاثیر سیلیکون و نانوذرات سیلکون بر *P. carotovorum* subsp. *carotovorum در محیط کشت مایع*

غلظت‌های مختلف سیلیکون در زمان‌های مختلف پس از کشت باکتری بیمارگر نتوانستند مانع رشد آن شده و تفاوت معنی‌داری بین آنها و شاهد مشاهده نگردید. NS1 فقط تا شش ساعت پس از کشت تا حدودی از رشد باکتری بیماری‌زا ممانعت نمود اما پس از آن، تفاوتی با شاهد نشان نداد. NS2 در طول ۱۰ ساعت پس از کشت، توانست غلظت باکتری بیماری‌زا را نسبت به شاهد کاهش دهد اما بعد از ۲۴ ساعت، اختلاف آن با شاهد معنی‌دار نبود. تیمار NS4 در طول ۱۰ ساعت پس از کشت، توانست به‌طور کامل مانع رشد باکتری بیماری‌زا شود ولی ۲۴ ساعت پس از کشت، ممانعت کنندگی آن کاهش یافت و میزان جذب نوری در این زمان بدون اختلاف معنی‌دار اندکی کمتر از تیمار شاهد بود (شکل۱).



شکل ۱. رشد (*P.c*) *Pectobacterium carotovorum* در محیط کشت مایع در حضور سیلیکون و نانوسیلیکون. **A.** سیلیکون در غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار (S1, S2, S4)، **B.** نانوسیلیکون در غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار (NS1, NS2, NS4).

Figure 1. Growth of *Pectobacterium carotovorum* (*P.c*) in liquid medium in the presence silicon and silicon nanoparticles. **A.** Silicon at the concentrations of 1, 2 and 4 milli molar (S1, S2, S4), **B.** Silicon nanoparticles at the concentrations of 1, 2 and 4 milli molar (NS1, NS2, NS4).

تاثیر سیلیکون و نانو ذرات سیلکون بر *B. methylotrophicus در محیط کشت مایع*

غلظت‌های مختلف سیلیکون تا چهار ساعت پس از کشت، از نظر تاثیر بر رشد باکتری آنتاگونیست، تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند اما شش و ۱۰ ساعت بعد از کشت، میزان جذب نوری در همه تیمارها کمتر از شاهد بود. با گذشت ۲۴ ساعت، S1 و S4 مشابه شاهد ولی S2 با اختلاف غیرمعنی‌دار، اندکی کمتر از شاهد بود. غلظت‌های مختلف نانوذرات سیلیکون تنها بعد از شش

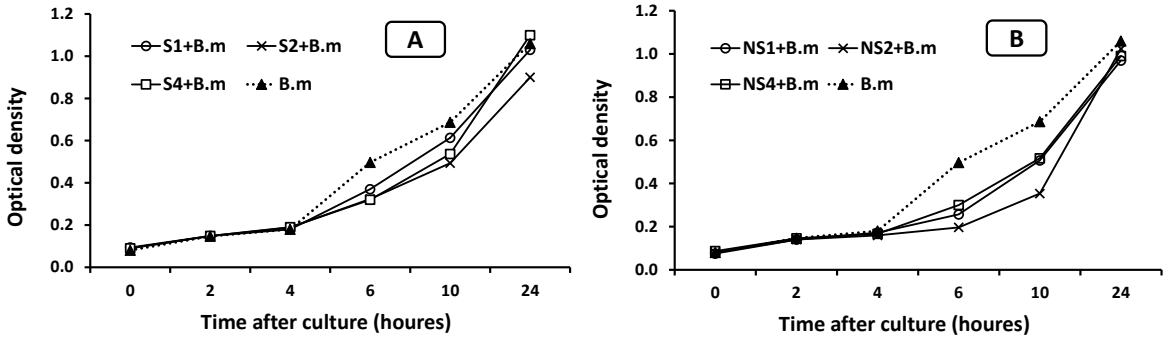
www.SID.ir

Archive of SID

و ۱۰ ساعت از کشت باکتری آنتاگونیست توانستند تا حدی مانع افزایش جمعیت آن شوند اما با گذشت ۲۴ ساعت، ممانعتی از افزایش جمعیت باکتری مشاهده نشد (شکل ۲).

آزمون‌های گلخانه‌ای

تجزیه واریانس برخی خصوصیات فیزیولوژیکی گیاهان سیب‌زمینی تلقیح شده با باکتری آنتاگونیست یا تیمار شده با سیلیکون و نانوذرات سلیکون نشان داد که بین تیمارها از نظر وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد وجود دارد (جدول ۱).



شکل ۲. رشد (*B.m*) *Bacillus methylotrophicus* در محیط کشت مایع در حضور سیلیکون و نانوسیلیکون. **A.** سیلیکون در غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار (S1, S2, S4)، **B.** نانوسیلیکون در غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار (NS1, NS2, NS4).

Figure 2. Growth of *Bacillus methylotrophicus* (*B.m*) in liquid medium in the presence of silicon and silicon nanoparticles. **A.** Silicon at the concentrations of 1, 2 and 4 milli molar (S1, S2, S4), **B.** Silicon nanoparticles at the concentrations of 1, 2 and 4 milli molar (NS1, NS2, NS4).

جدول ۱. تجزیه واریانس برخی ویژگی‌های رشدی گیاهان سیب‌زمینی تیمار شده با باکتری آنتاگونیست *Bacillus metylothrophicus* و غلظت‌های مختلف سیلیکون و نانوذرات سیلیکون و کشت شده در خاک آلوده به *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Table 1. Analysis of variance for some growth characteristics of potato plants treated with antagonistic bacterium *Bacillus metylothrophicus* and various concentrations of silicon and silicon nanoparticles grown in contaminated soil with *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Mean of squares				Source of variation
Shoot fresh weight	Shoot dry weight	Root fresh weight	Root dry weight	
518.5*	3.28*	120.7*	0.56*	Treatment
65.9	0.76	4.7	0.04	Error

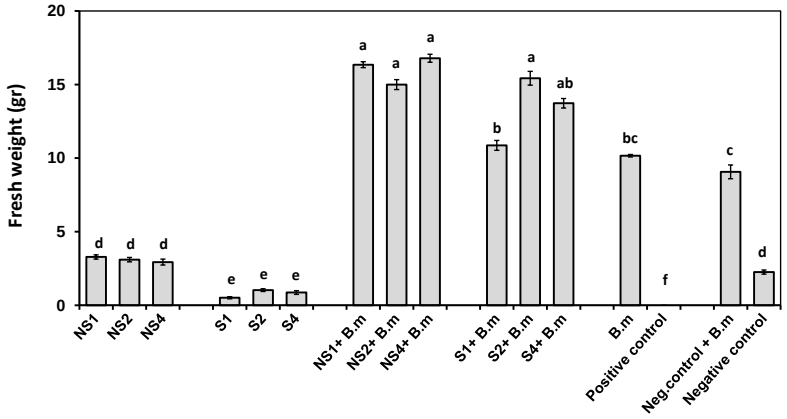
*Indicating significant difference at 5% level of significance

وزن تر ریشه‌ها

مقایسه میانگین تیمارها با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد نشان داد که باکتری باسیلوس به‌تنهایی بدون حضور بیمارگر (negative control + *B.m*) وزن تر ریشه را در مقایسه با شاهد منفی افزایش می‌دهد. در تیمار شاهد مثبت، غده‌ها بعد از کشت، دچار لهیدگی شده و از بین رفتند و هیچ ریشه‌ای تولید نشد بنابراین، وزن ریشه در آنها صفر در نظر گرفته شد. در تمام تیمارهای دیگر، غده‌ها تولید ریشه کرده و در همه آنها، اختلاف وزن تر ریشه با شاهد مثبت، معنی‌دار بود. در حضور باکتری بیمارگر، بیش‌ترین وزن تر در تیمارهای ترکیبی نانوسیلیکون با باسیلوس (NS1 + *B.m*, NS2 + *B.m*, NS4 + *B.m*) و یا سیلیکون با باسیلوس (S1 + *B.m*, S2 + *B.m*, S4 + *B.m*) و تیمار باسیلوس (*B.m*) به‌دست آمد. کمترین میزان وزن تر ریشه نیز در تیمارهای سیلیکون مشاهده شد (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

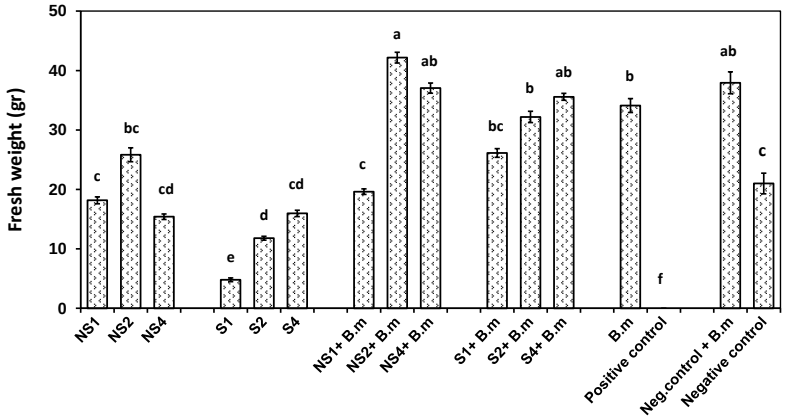


شکل ۳. تاثیر تیمار غده‌های سیب زمینی با سیلیکون در غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار (S1, S2, S4)، نانوذرات سیلیکون در غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار (NS1, NS2, NS4)، باکتری آنتاگونیست *Bacillus metylothrophicus* (*B. m*) و یا با ترکیبی از باکتری و مواد مذکور بر وزن تر ریشه گیاهان پس از کاشت غده‌ها در خاک آلوده به *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Figure 3. Effect of potato tuber treatment with silicon at concentrations 1, 2 and 4 milli molar (S1, S2, S4), silicon nanoparticles at concentrations 1, 2 and 4 milli molar (NS1, NS2, NS4), antagonistic bacterium *Bacillus metylothrophicus* (*B.m*) or with combination of bacterium and above mentioned compounds, on root fresh weight after growing the tubers in soil contaminated with *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

وزن تر اندام‌های هوایی

باکتری باسیلوس به‌تنهایی و بدون حضور بیمارگر (negative control + *B.m*) توانست وزن تر اندام‌های هوایی را در مقایسه با شاهد منفی افزایش دهد و از این نظر نیز دوباره ویژگی‌های یک باکتری PGPR را نشان داد. در تیمار شاهد مثبت، غده‌ها پس از کشت کاملاً دچار پوسیدگی شده و هیچ نوع اندام هوایی تولید نکردند. در حضور باکتری بیمارگر، بیش‌ترین وزن تر اندام‌های هوایی در تیمارهای ترکیبی سیلیکون و نانوسیلیکون دو و چهار میلی‌مولار با باسیلوس و نیز در تیمار باسیلوس به‌دست آمد. کمترین میزان وزن تر اندام‌های هوایی نیز در تیمارهای سیلیکون و NS4 مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴. تاثیر تیمار غده‌های سیب زمینی با سیلیکون در غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار (S1, S2, S4)، نانوذرات سیلیکون در غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار (NS1, NS2, NS4)، باکتری آنتاگونیست *Bacillus metylothrophicus* (*B.m*) و یا با ترکیبی از باکتری و مواد مذکور بر وزن تر اندام‌های هوایی گیاهان پس از کاشت غده‌ها در خاک آلوده به *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Figure 4. Effect of potato tuber treatment with silicon at concentrations 1, 2 and 4 milli molar (S1, S2, S4), silicon nanoparticles at concentrations 1, 2 and 4 milli molar (NS1, NS2, NS4), antagonistic bacterium *Bacillus metylothrophicus* (*B.m*) or with combination of bacterium and above mentioned compounds, on shoot fresh weight after growing the tubers in soil contaminated with *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

وزن خشک ریشه‌ها

باکتری باسیلوس به تنهایی بدون حضور بیمارگر (negative control + *B.m*) توانست وزن خشک ریشه را در مقایسه با شاهد منفی به مقدار حدود سه برابر برساند. تمامی تیمارهای مورد استفاده توانستند وزن خشک ریشه را در مقایسه با گیاهان شاهد مثبت افزایش دهند. بالاترین مقدار وزن خشک ریشه در

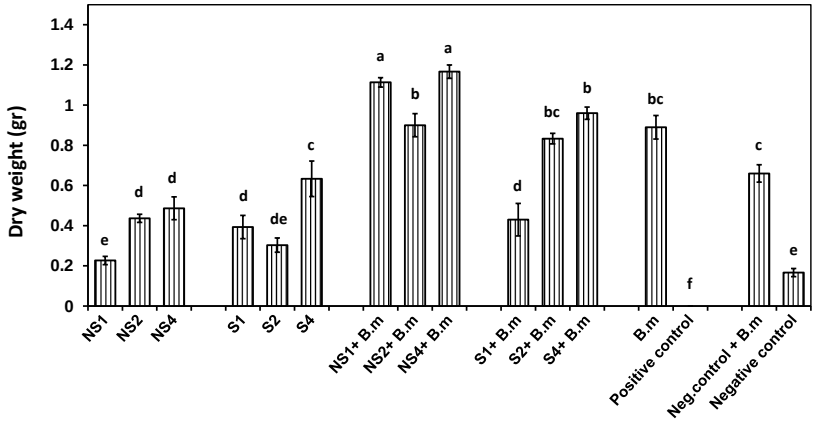
www.SID.ir

Archive of SID

تیمارهای ترکیبی نانو سیلیکون با باسیلوس، S4+*B.m* و S2+*B.m* و باکتری باسیلوس مشاهده شد و کمترین میزان نیز مربوط به تیمارهای سیلیکون و نانوذرات سیلیکون بود (شکل ۵).

وزن خشک اندام‌های هوایی

باکتری باسیلوس به‌تنهایی (negative control + *B.m*) بدون حضور بیمارگر توانست وزن خشک اندام‌های هوایی را در مقایسه با شاهد منفی اندکی (بدون اختلاف معنی‌دار) افزایش دهد. تمامی تیمارها وزن خشک اندام‌های هوایی را در مقایسه با شاهد مثبت به‌طور معنی‌داری افزایش دادند. بیشترین مقدار در تیمار-های ترکیبی NS2 + *B.m*, NS4 + *B.m*, S2 + *B.m*, S4 + *B.m* و تیمار *B.m* و کمترین مقدار نیز در تیمارهای NS4 و S1 به دست آمد (شکل ۶).



شکل ۵. تاثیر تیمار غده‌های سیب زمینی با سیلیکون در غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار (S1, S2, S4)، نانوذرات سیلیکون در غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار (NS1, NS2, NS4)، باکتری آنتاگونیست *Bacillus metylothrophicus* (*B.m*) و یا با ترکیبی از باکتری و مواد مذکور بر وزن خشک ریشه گیاهان پس از کاشت غده‌ها در خاک آلوده به *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

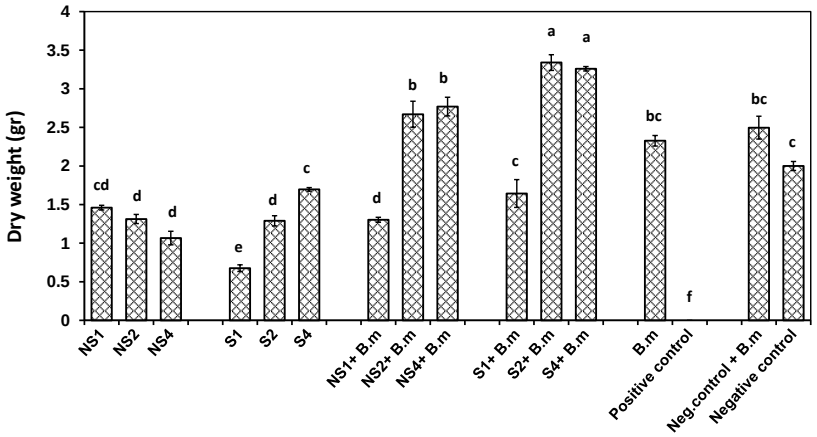
Figure 5. Effect of potato tuber treatment with silicon at concentrations 1, 2 and 4 milli molar (S1, S2, S4), silicon nanoparticles at concentrations 1, 2 and 4 milli molar (NS1, NS2, NS4), antagonistic bacterium *Bacillus metylothrophicus* (*B.m*) or with combination of bacterium and above mentioned compounds, on root dry weight after growing the tubers in soil contaminated with *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

شدت بیماری

کلیه تیمارهای سیلیکون و نانوسیلیکون و باکتری باسیلوس توانستند از بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی به‌طور کامل ممانعت کنند. در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی این گیاهان هیچ نوع علائم بیماری از قبیل زردی، پژمردگی، پوسیدگی و گیاهچه‌میری مشاهده نشد و شدت بیماری در تمامی آن‌ها برابر با صفر بود. در تیمار شاهد مثبت (گلدان‌های حاوی فقط باکتری بیماریزا) شدت بیماری ۱۰۰٪ بود و تمام غده‌ها لهیده و پوسیده شده و از بین رفتند بنابراین هیچ ریشه و ساقه‌ای نیز تولید نگردید. نتایج بررسی شدت بیماری در شرایط گلخانه‌ای، در هر سه بار تکرار آزمایش مشابه هم بوده و نتایج یکسانی به‌دست آمد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶. تاثیر تیمار غده‌های سیب زمینی با سیلیکون در غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار (S1, S2, S4)، نانوذرات سیلیکون در غلظت‌های یک، دو و چهار میلی‌مولار (NS1, NS2, NS4)، باکتری آنتاگونیست *Bacillus metylothrophicus* (*B.m*) و یا با ترکیبی از باکتری و مواد مذکور بر وزن خشک اندام‌های هوایی گیاهان پس از کاشت غده‌ها در خاک آلوده به *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Figure 6. Effect of potato tuber treatment with silicon at concentrations 1, 2 and 4 milli molar (S1, S2, S4), silicon nanoparticles at concentrations 1, 2 and 4 milli molar (NS1, NS2, NS4), antagonistic bacterium *Bacillus metylothrophicus* (*B.m*) or with combination of bacterium and above mentioned compounds, on shoot dry weight after growing the tubers in soil contaminated with *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

بحث

کنترل عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد به‌دلیل شرایط پیچیده ریزوسفر و تبادلات بیوشیمیایی و بیولوژیک گیاه با محیط اطراف آن، همواره با مشکلاتی همراه بوده است لذا استفاده از روش‌های تلفیقی و القای مقاومت، در کنترل این بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Reignault & Walters 2007; Sabbag *et al.* 2016; Safari *et al.* 2020). در این پژوهش، تاثیر سیلیکون و نانوذرات سیلیکون به‌عنوان القا کننده‌های مقاومت و باکتری آنتاگونیست *B. metylothrophicus* در مهار بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی و تاثیر آنها بر برخی خصوصیات رشدی گیاه بررسی شد.

در بررسی توان آنتاگونیستی باکتری *B. metylothrophicus* با روش انتشار از حلقه کاغذی و نشت در چاهک، شعاع هاله بازداری از رشد *P. caratovorum* به ترتیب ۹ و ۸/۵ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. این نتایج نشان داد که باسیلوس، آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد بازدارنده زیادی تولید می‌کند که در آگار انتشار یافته و باعث مهار بیمارگر می‌شوند. طبق یک گزارش تحقیقی، باکتری مذکور لیپوپپتیدهایی از خانواده‌های سورفکتین (Surfactin)، ایتورین (Iturin) و فنجی‌سین (Fengycin) شامل چهار نوع لیپوپپتید، چهار نوع پومیلاسیدین (Pumilacidin)، پنج نوع ایتورین‌آ، پنج نوع از باسیلومایسین‌دی (Bacillomycin D) و شش نوع فنجی‌سین تولید می‌کند (Jemil *et al.* 2017). در یک تحقیق دیگر Joorabbaf *et al.* (2018) نشان دادند که *B. metylothrophicus* با تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند رشد شعاعی *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* Snyder & Hansen و *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. را به‌ترتیب ۷۸ و ۸۰ درصد مهار کند. Parsa *et al.* (2018) نیز ممانعت از رشد شعاعی قارچ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* عامل پژمردگی گوجه‌فرنگی به‌وسیله همین گونه از باکتری آنتاگونیست را به میزان ۵۴ درصد در مقایسه با شاهد گزارش کردند لذا در تحقیق حاضر نیز ممکن است تولید آنتی-بیوتیک‌ها در بازداری از رشد باکتری عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی دخیل باشد.

در آزمون کلروفرم، باکتری آنتاگونیست با روش آنتی‌بیوز توانست هاله بازداری به شعاع ۱۵ میلی‌متر ایجاد کند. Khodakaramian & Zafari (2009) نیز در تحقیق خود گزارش کردند که باکتری باسیلوس می‌تواند هاله بازداری از رشد *P. caratovorum* به قطر ۲۰ تا ۶۰ میلی‌متر ایجاد کند. این محققین، علت این بازداری را تولید آنتی‌بیوتک‌ها و متابولیت‌های سمی ذکر نمودند. با توجه به گزارشات موجود و دلایل ذکر شده، نتایج این تحقیق با یافته‌های سایر محققین مطابقت و هماهنگی کامل دارد.

در روش حلقه کاغذی و روش نشت در چاهک، سیلیکون و نانوذرات سیلیکون با غلظت‌های یک، دو و چهارمیلی‌مولار

www.SID.ir

Archive of SID

نتوانستند هیچ نوع هاله بازداری از رشد باکتری آنتاگونیست و یا باکتری بیمارگر ایجاد کنند. به‌نظر می‌رسد که این مواد فاقد تاثیر مستقیم مهارکنندگی روی باکتری‌های مورد بررسی هستند (همان‌گونه که در آزمون‌های حلقه کاغذی و چاهک نیز این تاثیر مشاهده نگردید) و یا احتمالاً دارای تاثیر اندکی هستند که در مورد نانوذرات سیلیکون (NS2 ,NS4) شش تا ۱۰ ساعت پس از کشت در محیط مایع مشاهده شد. البته این تفاوت‌ها با تیمار شاهد در هیچکدام از موارد، معنی‌دار نبود. پس از گذشت ۲۴ ساعت نیز تفاوت معنی‌داری بین تیمارها و شاهد وجود نداشت.

در بررسی‌های گلخانه‌ای، وزن تر و خشک ریشه در بوته‌هایی که فقط با *B. metylothrophicus* و بدون حضور بیمارگر تیمار شده بودند حدود سه برابر تیمار شاهد منفی بود (افزایش ۲۰۰ درصدی با تفاوت آماری معنی‌دار). وزن تر اندام‌های هوایی نیز حدود دو برابر تیمار شاهد منفی (افزایش ۱۰۰ درصدی با تفاوت آماری معنی‌دار) و وزن خشک اندام‌های هوایی اندکی بیشتر از شاهد منفی بود (افزایش ۲۵ درصدی بدون تفاوت آماری معنی‌دار). حتی در حضور باکتری بیمارگر در خاک نیز علیرغم اینکه در تیمار شاهد آلوده تمامی غده‌ها پوسیده و از بین رفتند اما باکتری *B. methylotrophicus* توانست ضمن کنترل صد درصد بیماری، ویژگی‌های رشدی گیاهان سیب‌زمینی را نیز به‌مقدار زیادی ارتقا دهد بنابراین، خاصیت افزایش دهندگی رشد گیاه به‌وسیله این باکتری مورد تایید قرار گرفت. این نتیجه با گزارش‌های بسیاری از محققین دیگر در مورد تاثیر این باکتری بر بیمارگرهای دیگر، مطابقت دارد. Parsa *et al.* (2018) تاثیر باکتری مذکور در کاهش شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی را حدود ۷۹ درصد گزارش کرده و نشان دادند که این باکتری موجب افزایش ۴۰-۳۰ درصدی در وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی و افزایش ۵۰-۴۰ درصدی در وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی می‌شود. Cheng *et al.* (2019) نیز نشان دادند که آنتاگونیست مذکور نه تنها پوسیدگی پایه ذرت را مهار می کند بلکه در شرایط مزرعه‌ای، ارتفاع گیاه، قطر ساقه و عملکرد دانه را نیز به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش می‌دهد. در آزمایشات انجام گرفته توسط Ge *et al.* (2016) نشان داده شد که باکتری *B. methylotrophicus* در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی، وزن تر گیاهچه را ۲۷/۴٪، طول گیاهچه را ۱۲/۵٪ و طول ریشه‌چه را ۵۷/۷٪ در مقایسه با شاهد افزایش می‌دهد. در آزمایش حاضر، گونه *B. methylotrophicus* توانست بیماری را صد درصد مهار کند. علیرغم سوال برانگیز بودن این مسئله، دوبار تکرار آزمایش همان نتایج قبلی را به‌دنبال داشت و این مسئله حاکی از توان بالای باکتری مذکور در تولید ترکیبات ضد باکتریایی و تحریک سیستم دفاعی گیاه بود. در این تحقیق، علل افزایش مقاومت گیاهان در برابر بیمارگر و میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی و نوع آنتی‌بیوتیک‌های تولیدی بررسی نشد اما طبق اظهارنظر شرکت تهیه‌کننده، این باکتری توان فوق‌العاده‌ای در تولید مواد بازدارنده از جمله ایتورین آ دارد که منجر به تجاری‌سازی آن شده است و بر همین اساس، این باکتری تاثیر خود را در مهار باکتری عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی نشان می‌دهد. بر اساس گزارشات تحقیقی، ایتورین نه تنها در شرایط آزمایشگاهی سمیت قارچی قوی نشان می‌دهد بلکه پاسخ‌های دفاعی گیاه را هم تحریک کرده و شدت بیماری‌های گیاهی را کاهش می‌دهد (Gu *et al.* 2017) و انواع مختلفی مانند E, D, C, A، باسیلومایسین L, F, D، باسیلوپپتین‌ها (Bacillopeptin) و مایکوسوبتیلین (Mycosubtilin) دارد (Yang *et al.* 2015). در یک تحقیق نشان داده شد که تیمار غده‌های سیب‌زمینی با گونه دیگری از باسیلوس به‌نام *B. amyloliquefaciens* Ar10 به‌مدت ۷۲ ساعت، مساحت و عمق بافت نکروزه سیب‌زمینی ناشی از باکتری مولد پوسیدگی نرم را ۱۰۰ درصد و افت محصول را ۸۵ درصد کاهش می‌دهد و این تاثیر حفاظتی در برابر بیمارگر، به تولید بیوسورفکتانت‌هایی مثل ترکیبات گلیکولیپیدی به‌وسیله باکتری آنتاگونیست نسبت داده شد (Azaiez *et al.* 2018). گزارش شده که بیوسورفکتانت‌هایی مثل سورفکتین، فنجی‌سین و ایتورین تولیدی به‌وسیله گونه‌های باسیلوس، خواص ضدمیکروبی با طیف اثر وسیع دارند (Li *et al.* 2016b) و اثر کشندگی بیوسورفکتانت‌ها می‌تواند به توانایی آنها در نفوذ به غشای سلولی و ایجاد اختلالات مختلف ساختمانی در این غشا باشد (Gomma 2013). دو گونه دیگر از باسیلوس به نام‌های *B. pumilus* و *B. amyloliquefaciens* نیز در تحقیقات برخی محققین دیگر برای کاهش پوسیدگی نرم غده‌های سیب‌زمینی مورد استفاده قرار گرفته و به‌ترتیب ۶۴ و ۴۹٪ باعث کاهش لهیدگی غده‌ها شده‌اند. طبق این گزارش، هشت ساعت پس از کاربرد آنها، مقادیر بالای فنیل‌آلانین آمونیالیاز، پلی‌فنل اکسیداز، پراکسیداز و فنل کل در گیاه مشاهده و اندازه‌گیری گردید (Gerayeli *et al.* 2017). از بین باکتری‌های گرم مثبت، گونه‌های باسیلوس توانسته‌اند بیماری‌های گیاهی را با روش‌های مختلفی از جمله عمل آنتی‌بیوز (Antibiosis)، رقابت برای مواد غذایی و فضا، تولید ترکیبات ضدمیکروبی مانند لیپوپپتیدها،

www.SID.ir

Archive of SID

آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتریوسین‌ها (Bacteriocins) و با تحریک پاسخ‌های دفاعی گیاه میزبان مهار کنند (Chung *et al*. 2008; Raaijmakers *et al*. 2010). استرین‌هایی از گونه‌های *B. cereus*، *B. subtilis* و *B. weihenstephanensis* نیز برای مهار باکتری عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی موثر گزارش شده‌اند (Krzyzanowska *et al*. 2012).

مهمترین نوآوری این تحقیق، استفاده از سیلیکون و نانوذرات سیلیکون در کنترل بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی بود. مطابق بررسی منابع صورت گرفته، در این خصوص تاکنون هیچ گزارشی ارائه نشده است و مهار بیماری به‌وسیله این دو ماده القا کننده در شرایط آزمایشگاهی، برای اولین بار در این تحقیق نشان داده شد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که هر چند سیلیکون و نانوذرات سیلیکون تاثیر بازدارندگی مستقیمی روی بیمارگر ندارند اما موجب مهار کامل بیماری می‌شوند، بنابراین به‌نظر می‌رسد که این ترکیبات از طریق القای مقاومت سیستمیک در گیاه و افزایش میزان آنزیم‌های دخیل در مقاومت القایی باعث ممانعت از پوسیدگی غده‌های سیب‌زمینی و از طرف دیگر باعث افزایش رشد گیاه شده‌اند. در مورد مواد القا کننده مقاومت ازجمله سیلیکون و نانوسیلیکون، تحقیقات سایر محققین نیز نشان دهنده تاثیر آنها در القای مقاومت سیستمیک اکتسابی در گیاهان است. گزارش شده که سیلیکون، مقاومت در برابر تنش‌های زیستی را از طریق تحریک تولید ترکیبات دفاعی مانند مواد فنلی و فایتوالکسین‌ها افزایش داده (Remus-Borel *et al*. 2005) و باعث فعال شدن برخی آنزیم‌های دفاعی مانند پراکسیداز، لیپوکسی‌ژناز (Lipoxigenase)، پلی‌فنل‌اکسیداز و فنیل‌آلانین آمونیالیاز شده است (Rahman *et al*. 2015). نانوذرات سیلیکون بعد از جذب در گیاه، در دیواره سلول‌های اپیدرمی یک پوشش دو لایه‌ای تشکیل داده و به‌عنوان مواد استحکام‌بخش دیواره سلولی عمل می‌کنند که عاملی برای پیشگیری از آلودگی‌های قارچی و باکتریایی و نماتدی بوده و مقاومت گیاهان را افزایش می‌دهند (Strout *et al*. 2013). در برخی گزارشات تحقیقی، به تاثیر سیلیکون در مهار بیماری‌های گیاهی اشاره شده است. به‌عنوان مثال Joorabbaf *et al*. (2018) نشان دادند که کاربرد سیلیکون و نانوذرات سیلیکون در شرایط گلخانه‌ای، شدت بیماری لکه‌موجی سیب‌زمینی را ۵۰-۲۵ درصد کاهش داده است که به‌دلیل تحریک مقاومت اکتسابی سیستمیک می‌باشد. کاربرد سیلیکون، شدت پژمردگی باکتریایی ناشی از *Ralstonia solanacearum* (Smith) Safni et al. درگوجه فرنگی را از طریق افزایش بیان ژن مربوط به دفاع در گیاه کاهش داده است (Diogo & Wydra 2007). کاربرد ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سیلیکون در آب آبیاری باعث مهار لکه سیاه رز شده است (Gillman *et al*. 2003). کود سیلیکون در برنج موجب کاهش بیماری بلاست به‌میزان ۸۶-۷۳ درصد و کاهش لکه قهوه‌ای برنج به‌میزان ۷۵-۵۸ درصد و سرکوب بیماری‌های ویروسی و باکتریایی می‌شود (Jinger *et al*. 2017). پاشش سیلیکون روی برگ‌های توتون نیز موجب کاهش معنی‌دار جمعیت باکتری عامل پژمردگی توتون در ریشه‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز، بتا ۱و۳-گلوکاناز و افزایش بیان ژن‌های دفاعی گردیده است (Li *et al*. 2016a). با توجه به موارد متعدد فوق، نتایج حاصل در این تحقیق با یافته‌های سایر پژوهشگران مطابقت داشت.

با توجه به نتایج حاصله در تحقیق حاضر مبنی بر عدم تاثیر سوء سیلیکون و نانوسیلیکون روی باکتری آنتاگونیست و نیز بر اساس گزارشات مربوط به تاثیر خوب و مثبت نانوذرات سیلیکون روی باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه (Karunakaran *et al*. 2013)، در این تحقیق نشان داده شد که کاربرد ترکیبی نانوذرات سیلیکون یا سیلیکون همراه با باکتری آنتاگونیست، باعث افزایش ویژگی‌های رشدی گیاه می‌گردد به‌طوری‌که بیش‌ترین وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی در تیمارهای ترکیبی نانوسیلیکون یا سیلیکون با باکتری آنتاگونیست به‌دست آمد. این تیمارهای ترکیبی در صورت داشتن قدرت مهار بیماری در شرایط مزرعه‌ای، می‌توانند قابل توصیه به کشاورزان برای مهار بیماری مهم پوسیدگی نرم و نیز در راستای دستیابی به عملکرد بالاتر محصول سیب‌زمینی باشند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله، از شرکت رویان تیسان سبز به خاطر فراهم کردن و ارسال باکتری آنتاگونیست *B. metylothrophicus* و از آزمایشگاه باکتری شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان برای فراهم کردن باکتری بیمارگر صمیمانه قدردانی می‌کنند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

Ahmadi K, Ebadzadeh HR, Hatami F, Abdshah H, Kazemian A, 2019. Agricultural Statistical Report of Cropping Year 2017-2018. Volume 1: crop production. Ministry of Agriculture-jahad, Planning and Economic Affairs, Communication and Information Technology Center. 87 pp.

Azadmanesh S, Mozafari J, Hasanzadeh N, Moslemkhani C, 2017. *In vitro* evaluation of potato genotypes for resistance against bacterial soft rot (*Pectobacterium carotovorum*) – a new tool for studying disease resistance. *Journal of Plant Protection Research* 57 (1): 1–8 (in Persian with English abstract).

Azaiez S, Ben Slimene I, Karkouch I, Essid R, Jallouli S, *et al.*, 2018. Biological control of the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* by *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ar10 producing glycolipid-like compounds. *Microbiological Research* 217: 22–23.

Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK, 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6: 71–79.

Bhat KA, Viswanath HS, Bhat NA, Wani TA, 2017. Bioactivity of various ethanolic plant extracts against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot of potato tubers. *Indian Phytopathology* 70 (4): 463–470.

Cheng X, Ji X, Ge Y, Li J, Qi W, *et al.*, 2019. Characterization of antagonistic *Bacillus methylotrophicus* isolated from rhizosphere and its biocontrol effects on maize stalk rot. *Phytopathology* 109 (4): 571–581.

Chung S, Kong H, Buyer JS, Lakshman DK, Lydon J, *et al.*, 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80: 115–123.

Cui J, Liu T, Li F, Yi J, Liu C, *et al*., 2017. Silica nanoparticles alleviate cadmium toxicity in rice cells: mechanisms and size effects. *Environmental Pollution* 228: 363–369.

Diogo RV, Wydra K, 2007. Silicon-induced basal resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* is related to modification of pectic cell wall polysaccharide structure. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 70: 120–129.

FAO, 2018. FAOSTAT/ production / crops, http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC

Ge B, Liu B, Nwet TT, Zhao W, Shi L, *et al.*, 2016. *Bacillus methylotrophicus* Strain NKG-1, Isolated from Changbai mountain, China, has potential applications as a biofertilizer or biocontrol agent. *PLOS ONE* 11 (11): e0166079.

Gerayeli N, Baghaee-Ravari S, Tarighi S, 2017. Evaluation of the antagonistic potential of *Bacillus* strains against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and their role in the induction of resistance to potato soft rot infection. *European Journal of Plant Pathology* 150: 1049–1063.

Gillman JH, Zlesak DC, Smith JA, 2003. Applications of potassium silicate decrease black spot infection in *Rosa hybrida* Meipelta (Fuschia Meidiland™). *Horticulture Science* 38: 1144–1147.

Gomaa EZ, 2013. Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain M104 grown on whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56: 259–268.

Gu Q, Yang Y, Yuan Q, Shi G, Wu L, *et al*. 2017. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum. Applied Environmental Microbiology* 83 (19): e01075–17.

Haghighi M, Afifipour Z, Mozafarian M, 2012. The effect of N–Si on tomato seed germination under salinity levels. *Journal of Biological and Environmental Sciences* (16): 87–90.

Haghighi M, Pessarakli M, 2013. Influence of silicon and nano-silicon on salinity tolerance of cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at early growth stage. *Scientia Horticulturae* 16: 111–117.

Jemil N, Manresa A, Rabanal F, Ben-Ayed H, Hmidet N, *et al.*, 2017. Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain. *Journal of Chromatography* B 1060: 374–386.

Jinger D, Devi MT, Dhar Sh, Dass A, Rajanna GA, *et al.*, 2017. Silicon in mitigating biotic stresses in rice (*Oryza sativa* L.) - a review. *Annals of Agricultural Research, New Series* 38 (1): 1–14.

www.SID.ir

Archive of SID

Joorabbaf P, Viani A, Ghasemi M, 2018. The effect of silicon and silicon nanoparticles on early blight disease of tomato and potato at laboratory and glasshouse conditions. *Proceedings of the 23nd Iranian Plant Protection Congress*, 27-30 Aug, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources. P. 255 (in Persian with English abstract).

Joorabbaf P, Viani A, Parsa N, 2018. Biological control of early blight in tomato and potato and Fusarium wilt of tomato by application of *Bacillus methylotrophicus*. *Proceedings of the 23nd Iranian Plant Protection Congress*, 27-30 Aug, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources. P. 257 (in Persian with English abstract).

Karimi J, Mohsenzadeh S, 2016. Effects of silicon oxide nanoparticles on growth and physiology of wheat seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology* 63 (1): 119–123.

Karunakaran G, Suriyaprabha R, Manivasakan P, Yuvakkumar R, Rajendran V, *et al.*, 2013. Effect of nanosilica and silicon sources on plant growth promoting rhizobacteria, soil nutrients and maize seed germination. *IET Nanobiotechnology* 7 (3): 70–77.

Khodakaramian DH, Zafari D, 2009. Identification of fluorescent pseudomonads isolated from potato Rhizospher and assessment of their antagonistic activity towards *Pectobacterium carotovorum* under field condition. *Plant Pest and Diseases* 77 (1): 2–18.

Krzyzanowska DM, Potrykus M, Golanowska M, Polonis K, Gwizdek-Wisniewska A, *et al.*, 2012. Rhizosphere bacteria as potential biocontrol agents against soft rot caused by various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. strains. *Journal of Plant Pathology* 94: 367–378.

Li P, Ding W, Liu Q. Wang D, Wang R, *et al.*, 2016a. Mechanism of silicon and BTH-induced resistance to tobacco bacterial wilt. *Tobacco Science and Technology* 49 (7): 23–30.

Li X, Zhang Y, Wei Z, Guan Z, Cai Y, et al., 2016b. Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of Peach gummosis. *PLOS One* 11: 1–22.

Luyckx M, Hausman JF, Lutts S, Guerriero G, 2017. Silicon and plants: current knowledge and technological perspectives. *Frontiers in Plant Science* 8: 411.

Ning D, Song A, Fan F, Li Z, Liang Y, 2014. Effects of slag-based silicon fertilizer on rice growth and brown-spot resistance. *PLOS ONE* 9:e102681.

O'Farrell N, Houlton A, Horrocks BR, 2006. Silicon nanoparticles: applications in cell biology and medicine. *International Journal of Nanomedicine* 1 (4): 451–472.

Omardien S, Brul S, Zaat SA, 2016. Antimicrobial activity of cationic antimicrobial peptides against gram-positives: Current progress made in understanding the mode of action and the response of bacteria. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4: 111.

Ongena M, Jacques P, 2007. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* 16: 115–125.

Parsa N, Viani A, Arzanlou M, Aliasgharzad N, 2018. Evaluation of tomato cultivars for resistance to *Fusarium* wilt disease and influence of mycorhizal fungus *Glomus versiforme*, antagonistic bacterium *Bacillus methylotrophicus* and carbendazim fungicide on disease control. MSc thesis, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran (in Persian with English abstract).

Raaijmakers JM, De Bruijn I, Nybroe O, Ongena M, 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Review* 34: 1037–1062.

Rahman A, Wallis CM, Uddin W, 2015. Silicon-induced systemic defense responses in perennial ryegrass against infection by *Magnaporthe oryzae*. *Phytopathology* 105: 748–757.

Rangaraj S, Gopalu K, Rathinam Y, Periasamy P, Venkatachalam R, *et al.*, 2014. Effect of silica nanoparticles on microbial biomass and silica availability in maize rhizosphere. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 61 (6): 668–675.

Rasipour L, Aliasghar-zad N, 2017. Interaction of phosphate solubilizing bacteria and *Bradyrhizobium japanicum* on growth index, tuber production and absorption of some nutrients in soybean**.** *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 11 (40): 53–63.

www.SID.ir

Archive of SID

Reignault P, Walters D, 2007. Topical Application of Inducers for Disease Control. In: Walters D, Newton A, Lyon G (eds). Induced resistance for plant defense: A sustainable approach to crop protection. Blackwell Publishing, Ames, IA, Pp. 179–200.

Remus-Borel W, Menzies JG, Belanger RR, 2005. Silicon induces antifungal compounds in powdery mildew-infected wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66: 108–115.

Sabbagh SK, Sabbagh E, Abkho J, Zinati Fakhrabad F, 2016. The effect of salicylic acid to induce systemic resistance in cucumber plant to damping-off disease caused by *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 5 (2): 27–43 (in Persian with English abstract).

Safari E, Sharifi R, Abbassi S, 2020. Inhibition of wheat take-all disease using defenses-inducing compounds. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 9 (3): 1–10 (in Persian with English abstract).

Saha ND, Chaudhary A, Singh SD, Singh D, Walia S, *et al.*, 2015. Plant pathogenic microbial communication affected by elevated temperature in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*. *Current Microbiology* 71: 585–593.

Shan H, Zhao M, Chen D, Cheng J, Li J, *et al.*, 2013. Biocontrol of rice blast by the phenaminomethylacetic acid producer of *Bacillus methylotrophicus* strain BC79. *Crop Protection* 44: 29–37.

Shi C, Yan P, Li J, Wu H, Li Q, *et al.*, 2014. Biocontrol of *Fusarium graminearum* growth and deoxynivalenol production in wheat kernels with bacterial antagonists. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11: 1094–1105.

Strout G, Russell SD, Pulsifer DP, Erten S, Lakhtakia A, *et al.*, 2013. Silica nanoparticles aid in structural leaf coloration in the Malaysian tropical rainforest understorey herb *Mapania caudata*. *Annals of Botany* 112 (6): 1141–1148.

Sun D, Hussain HI, Yi Z, Rookes JE, Kong L, *et al*., 2016. Mesoporous silica nanoparticles enhance seedling growth and photosynthesis in wheat and lupin. *Chemosphere* 152: 81–91.

Tavakol Norabadi M, Sahebani N, Etebarian HR, 2014. Management of tomato wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* with silicon and *Pseudomonas fluorescens* (CHAO) and assaying activity of Phenylalanine ammonia lyase (PAL). *Research in Plant Pathology* 2 (3): 13–26 (in Persian with English abstract).

Yang H, Li X, Li X, Yu H, Shen Z, 2015. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin and surfactin by RP-HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407: 2529–2542.

Yousefi H, Sahebani N, Mirabolfathy M, Faravardeh L, Mahdavi V, 2011. The effect of salicylic acid and *Bacillus subtilis* on cucumber root and stem rot, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum*. *Iranian Journal of Plant Pathology* 46 (4): 85–87.

Yuan X, Hou X, Chang H, Yang R, Wang F, *et al.*, 2019. *Bacillus methylotrophicus* has potential applications against *Monilinia fructicola*. *Open Life Science* 14: 410–419.

Zhang C, Wang L, Zhang W, Zhang F, 2013. Do lignification and silicification of the cell wall precede silicon deposition in the silica cell of the rice (*Oryza sativa* L.) leaf epidermis?. *Plant Soil* 372: 137–149.

© 2020 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)

www.SID.ir